

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Danielly da Costa Silva**

**AVALIAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS  
CARBAPENÊMICOS ISOLADAS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO**

**Santa Maria, RS  
2017**

**Danielly da Costa Silva**

**AVALIAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS  
ISOLADAS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosmari Hörner

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Danielly da Costa  
Avaliação de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas em um hospital terciário / Danielly da Costa Silva.- 2017.  
49 f.; 30 cm

Orientadora: Rosmari Hörner  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Enterobacteriaceae 2. Klebsiella pneumoniae 3. Carbapenêmicos 4. Resistência bacteriana I. Hörner, Rosmari II. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Danielly da Costa Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

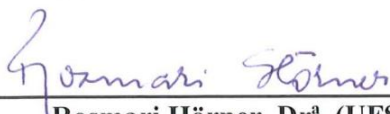
E-mail: daniellycosta07@gmail.com

**Danielly da Costa Silva**

**AVALIAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS  
ISOLADAS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO**

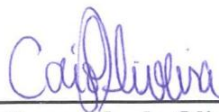
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 31 de maio de 2017:**



---

**Rosmari Hörner, Dr.<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Caio Fernando de Oliveira, Dr. (UNISC)**



---

**Máisa Tizotti, Dr.<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e Nossa Senhora, por me ampararem e me fortalecerem a cada momento.

Aos meus pais, Dalva e Domingos, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Dênnys, por sempre vibrar pelas minhas conquistas.

Ao meu marido Gildo, por toda compreensão e companheirismo em todas as horas.

À minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner, por me receber com carinho e por me conceder muitas oportunidades dentro do Laboratório de Bacteriologia.

À todos os meus colegas do Laboratório de Bacteriologia (LABAC/CCS), que me acolheram de braços abertos e que muito contribuíram para meu conhecimento e formação na universidade.

À comissão examinadora desta banca que se dispôs gentilmente a avaliar este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, a todos os professores do Curso de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ao Hospital Universitário de Santa Maria e aos funcionários do Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas, que compartilharam conhecimento e proporcionaram a execução deste trabalho.

Muito Obrigada a todos!

## RESUMO

### AValiação de Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos Isoladas em um Hospital Terciário

AUTORA: Danielly da Costa Silva  
ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosmari Hörner

A resistência aos antimicrobianos em enterobactérias é um grave problema de saúde pública. A rápida disseminação de genes e mecanismos de resistência aos antimicrobianos limitam as opções terapêuticas e implicam em um aumento na taxa de morbimortalidade dos pacientes. As bactérias produtoras de carbapenemase, como *Klebsiella pneumoniae* são consideradas importantes agentes de infecções hospitalares, devido à produção de carbapenemases. O objetivo deste estudo foi avaliar 178 amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) por métodos fenotípicos de difusão em disco e Blue-Carba, o seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo sistema automatizado VITEK<sup>®</sup> 2 (bioMérieux), além de detectar por Reação de cadeia de polimerase (PCR), o gene codificador de carbapenemase do tipo *bla<sub>KPC</sub>*. Essas amostras foram provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria/RS, e foram coletadas no período de um ano (julho de 2014 a julho de 2015). As amostras foram avaliadas através do teste de difusão em disco com inibidores de  $\beta$ -lactamases, tais como ácido fenilborônico (AFB), cloxacilina (CLOXA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), onde cepas com diferenças de diâmetros de halo  $\geq 5$ mm para discos suplementados ou não com os inibidores de  $\beta$ -lactamases foram consideradas produtoras de carbapenemases. *K. pneumoniae* foi a ERC prevalente, que apareceu em 80,3% dos casos (n = 143). Entre os materiais clínicos, o *swab* retal foi responsável por 43,4% dos isolamentos (n=62). Dos isolados de ERC identificados, 56,7% (n=101) foram supostos produtores de *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC), inibidos pelo AFB, enquanto que 7,3% (n=13) dos isolados foram inibidos tanto por AFB e CLOXA e foram considerados como supostos produtores de AmpC mediado por plasmídeo. Aproximadamente 3,4% (n=6) foram inibidos por EDTA, sendo possíveis produtores de metalo- $\beta$ -lactamase (MBL); 32,6% (n=58) apresentaram resultados negativos para a AFB, CLOXA e EDTA e representaram outra classe de  $\beta$ -lactamases ou mecanismo de resistência. Para detecção genotípica, foram utilizadas 172 amostras de ERC de diferentes espécimes clínicos. *K. pneumoniae* foi microrganismo prevalente com 139 (80,81%) dos isolados. O material clínico de maior isolamento foi *swab* retal (cultura de vigilância) com 48 amostras (34,53%). O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi detectado em 124 (72,09%) isolados. Na técnica de difusão de disco pelo AFB, 111 (64,53%) foram KPC e por Blue-Carba 121 (70,34%). Considerando a PCR como padrão ouro para este mecanismo de resistência, AFB evidenciou 80% de sensibilidade e 75% de especificidade. O teste bioquímico Blue-Carba apresentou 90% de sensibilidade e 81% de especificidade. A resistência à colistina foi identificada em 25 isolados de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (CR-Kp), sendo que 10 (7,19%) pacientes evoluíram a óbito por cepas CR-Kp e três (2,16%) por CR-Kp e resistente à colistina (CPR-Kp). A identificação dessas bactérias multirresistentes pelo laboratório é de suma importância para o isolamento imediato do paciente, além da adoção de medidas rigorosas de prevenção e controle de infecções para estes microrganismos multirresistentes.

**Palavras-chave:** *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae*. Carbapenêmicos. Resistência bacteriana.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF CARBAPENEMIC-RESISTANT ENTEROBACTERIA ISOLATED IN A TERTIARY HOSPITAL

AUTHOR: Danielly da Costa Silva  
ADVISOR: Prof. Dr.<sup>a</sup> Rosmari Hörner

Resistance to antimicrobials in enterobacteria is a serious public health problem. The rapid spread of genes and antimicrobial resistance mechanisms limit the therapeutic options and imply an increase in the morbimortality rate of patients. Carbapenemase-producing bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* are considered important agents of hospital infections due to the production of carbapenemases. The objective of this study was to evaluate 178 samples of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CREs) by phenotypic methods of disc diffusion and Blue Carba, their antimicrobial susceptibility profile by automated system VITEK®2 (bioMérieux), and to detect by Polymerase chain reaction (PCR) the *bla<sub>KPC</sub>* type carbapenemase encoding gene. These isolates come from a University Hospital in Santa Maria (HUSM), Santa Maria/RS, and were collected in a period of one year (July 2014 to July 2015). Isolates were assessed using disk diffusion tests with  $\beta$ -lactamases inhibitors such as phenylboronic acid (AFB), cloxacillin (CLOXA), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Isolates with differences in zone diameters  $\geq 5$ mm for disks supplemented or not were considered producers of carbapenemases. *K. pneumoniae* was the most prevalent CRE, which appeared in 80.3% cases (n=143). Among clinical materials the rectal swab was responsible for 43.4% of the isolations (n = 62). Among the CREs identified in this study the growth of 56.7% (n = 101) isolates which were putative producers of *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) were inhibited by AFB, whereas 7.3% (n = 13) isolates were inhibited by both AFB and CLOXA and were considered as putative producers of plasmid-mediated AmpC; approximately 3.4% (n = 6) were inhibited by EDTA, which possibly produced metallo- $\beta$ -lactamase. Lastly, 32.6% (n = 58) cases showed negative results for AFB, CLOXA, and EDTA sensitivity, and represented another class of  $\beta$ -lactamases and/or mechanism of resistance. For genotypic detection, 172 samples of CRE from different clinical specimens were obtained. *K. pneumoniae* was a prevalent microorganism with 139 (80.81%) of the isolates. The most isolated clinical material was rectal swab (surveillance culture) with 48 samples (34.53%). The *bla<sub>KPC</sub>* gene was detected in 124 (72.09%) isolates. In the disk diffusion technique by AFB 111 (64.53%) were KPC and by Blue-Carba 121 (70.34%). Considering PCR as the gold standard for this mechanism of resistance, AFB showed 80% sensitivity and 75% specificity. The Blue-Carba biochemical test showed 90% sensitivity and 81% specificity. Resistance to colistin was identified in 25 isolates of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-Kp), and 10 (7.19%) patients died of CR-Kp and three (2.16%) of CR-Kp and resistant to colistin (CPR-Kp). The identification of these multiresistant bacteria by the laboratory is of paramount importance for the immediate patient isolation, besides the adoption of rigorous measures of prevention and control of infections for these multiresistant microorganisms.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae*. Carbapenems. Bacterial resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos.....	12
Figura 2 – Distribuição epidemiológica de KPC no mundo.....	14
Figura 3 – Crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em ágar McConkey.....	15
Figura 4 – Tipos de mecanismos de resistência.....	16
Figura 5 – Teste fenotípico de difusão em disco utilizando inibidores $\beta$ -lactamases: AFB-deteção KPC/ EDTA- produtores de MBL/ AFB + CLOXA- produtores AmpC plasmidial .....	21
Figura 6 – Identificação através da PCR para deteção do gene <i>bla<sub>KPC</sub></i> .....	44
Figura 7 – Resultados através da metodologia Blue-Carba.....	44



## LISTA DE TABELAS

### PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Artigo 1 - Phenotypic methods for screening of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CREs) and assessment of the antimicrobial susceptibility profile

Table 1 –	Distribution of 178 CREs* isolated at the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) from July 2014 to July 2015 .....	34
Table 2 –	Distribution of CREs in clinical specimens and the resistance mechanism obtained in phenotypic tests .....	35
Table 3 –	Resistance profile and sensitivity of <i>Enterobacteriaceae</i> isolated in the study ..	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB	= Ácido fenilborônico
ANVISA	= Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLOXA	= Cloxacilina
DNA	= Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
EDTA	= Ácido etilenodiaminotetracético
ERC	= Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
GES	= Guiana-Extended-Spectrum
GN	= Gram Negativo
GP	= Gram Positivo
HUSM	= Hospital Universitário de Santa Maria
IMP	= Imipinemase
IRAS	= Infecções Relacionadas Assistência à Saúde
<i>K. pneumoniae</i>	= <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	= <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MβL	= Metallo-β-lactamase
NDM	= New Delhi metallo-β-lactamase
OMPs	= Porinas da membrana externa da bactéria
OXA-48	= OXA carbapenemases
PBPs	= Proteínas de ligação às penicilinas
PCR	= Reação em Cadeia da Polimerase
UTI	= Unidade de Tratamento Intensivo
VIM	= Verona Imipinemase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	14
1.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA EM ENTEROBACTÉRIAS .....	15
1.3	CARBAPENEMASES .....	18
1.4	RESISTÊNCIA À COLISTINA.....	19
1.5	MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARBAPENEMASES .....	20
1.6	OPÇÕES DE TRATAMENTO .....	22
1.7	JUSTIFICATIVA .....	22
1.8	OBJETIVOS .....	22
1.8.1	Objetivo geral.....	22
1.8.2	Objetivos específicos .....	23
<b>2</b>	<b>PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	24
2.1	ARTIGO 1 .....	25
2.2	MANUSCRITO 1 .....	37
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS ADICIONAIS</b> .....	41
3.1	DETECÇÃO FENOTÍPICA BLUE-CARBA .....	41
3.2	TESTE MOLECULAR.....	41
3.2.1	Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA).....	41
3.2.2	Detecção do gene <i>BLA<sub>KPC</sub></i> .....	42
3.2.3	Considerações éticas .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES ADICIONAIS</b> .....	43
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente um dos grandes problemas de saúde pública é o fenômeno da resistência bacteriana, que acarreta em complicações recorrentes em pacientes internados em unidades hospitalares, limitando as opções terapêuticas, além de causar elevadas taxas de morbidade e mortalidade (CAUMO et al., 2010; RODRIGUEZ-BANÑO et al., 2010). O desenvolvimento da resistência é um processo natural dos microrganismos, podendo ser acelerada pela pressão seletiva do uso inadequado dos antimicrobianos ou por genes de resistência adquiridos, como plasmídeos ou transposons, que são facilmente transferidos entre bactérias (DIENSTMANN et al., 2010).

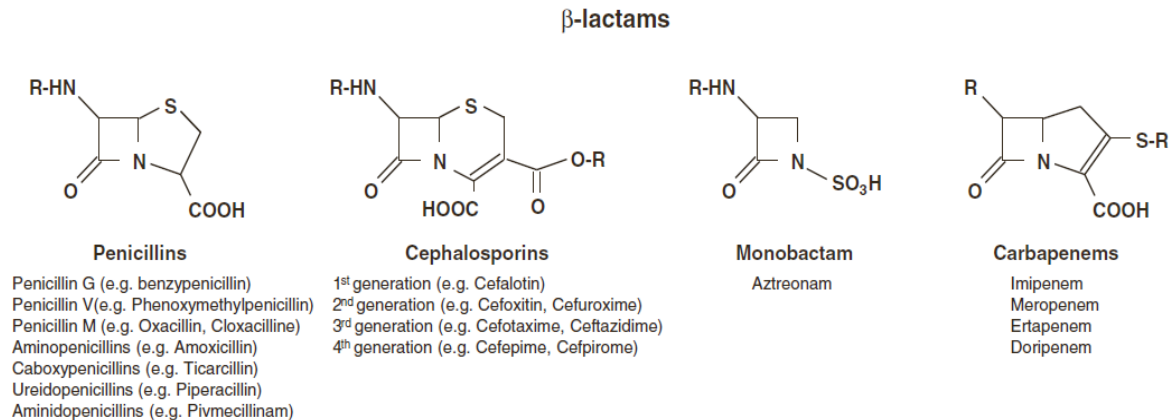
Entre as bactérias preocupantes pela crescente resistência aos antimicrobianos, destacam-se os bacilos Gram negativos (GN) pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que frequentemente são isolados em amostras biológicas, sendo responsáveis por infecções nosocomiais (MOAYEDNIA et al., 2014). Esses microrganismos geralmente são colonizadores da microbiota intestinal de humanos e estão entre os patógenos mais comuns que causam infecções como cistite, pneumonia, septicemia e infecções associadas a dispositivos médicos invasivos, que levam a quadros de infecções graves em pacientes imunocomprometidos. São fontes de infecções comunitárias e hospitalares, podendo se espalhar facilmente através do contato, alimentos e água contaminados (CARTER; SCOTT; PANG, 2015; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Entre esses agentes significativos de infecções hospitalares encontram-se *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) tornaram-se motivo de preocupação mundial, por apresentarem diversos mecanismos de resistência que afetam diferentes classes de antimicrobianos, como os  $\beta$ -lactâmicos usados na terapêutica. Estes mecanismos podem estar associadas à diminuição ou perda de porinas da membrana externa da bactéria (OMPs), produção de bombas de efluxo, mutações no sítio ativo de ligação do antimicrobiano e produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, como  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), AmpC plasmidiais e carbapenemases (DRAWZ; BONOMO, 2010; NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; TENOVER, 2006).

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos encontram-se entre os fármacos mais utilizados para o tratamento de infecções por bactérias Gram Positivas (GP) e GN (Figura 1). Possuem um anel  $\beta$ -lactâmico na sua estrutura molecular, podendo originar antimicrobianos derivados de

penicilina, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamase (BACEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Figura 1 – Antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos



Fonte: Adaptado de Nordmann, Poirel e Dortet (2012).

Durante anos os carbapenêmicos foram utilizados como terapia de última escolha para tratar infecções causadas por enterobactérias multiresistentes. Contudo, com o aumento da resistência aos carbapenêmicos, pela produção de enzimas carbapenemases que degradam esses antimicrobianos, as opções terapêuticas tornaram-se bastante limitadas. Essas enzimas são capazes de hidrolisar não só carbapenêmicos, mas também outros  $\beta$ -lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (MORRIL et al., 2015; PINTO et al., 2014).

Com o uso frequente dos carbapenêmicos em pacientes com doenças de base, o que favoreceu o aumento da resistência a essa classe de medicamentos, houve o retorno das polimixinas B e E (colistina), além da fosfomicida, tigeciclina e aminoglicosídeos no tratamento de infecções por ERC (GIANI et al., 2015). Porém, é crescente o número de estudos demonstrando a emergência da resistência às polimixinas (FERNANDES et al., 2016; GASPAR et al., 2015; GIANI et al., 2015). Este novo mecanismo de resistência às polimixinas (colistina) é motivo de grande preocupação, uma vez que contribui para disseminação do gene *mcr-1* mediado por plasmídios em cepas de *E. coli*, identificadas em animais na China (LUI et al., 2016), e recentemente detectadas em isolados clínicos no Brasil (FERNANDES et al., 2016).

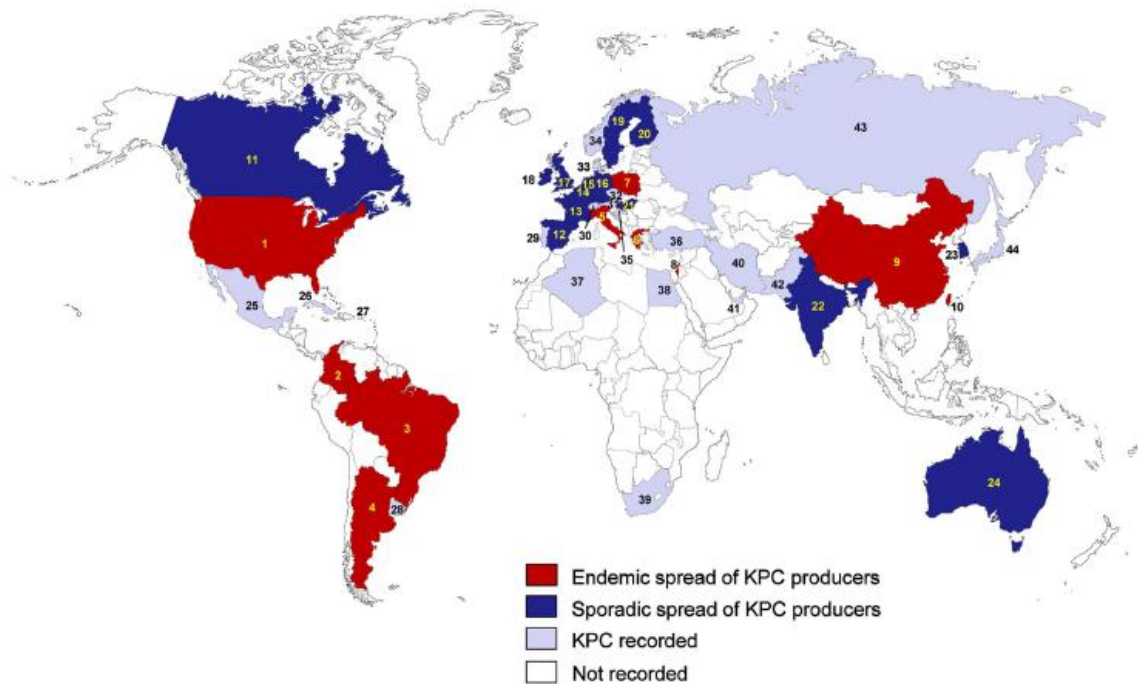
A produção de carbapenemase por bactérias GN é uma das formas mais comuns de resistência encontrada na unidade de terapia intensiva (UTI), na qual está associada cada vez

mais a resistência aos antibióticos atualmente comercializados (KARAM et al., 2016; LOGAN; WEINSTEIN, 2017).

As carbapenemases mais comumente encontradas em enterobactérias são as metallo-betalactamases (Imipinemase-IMP, Verona imipenemase-VIM e New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-NDM), as serinocarbapenemases (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-KPC e Guiana-Extended-Spectrum-GES) e as oxacilinas (OXA-carbapenemases-OXA-48) (PINTO et al., 2014).

Embora a origem epidemiológica e a distribuição das carbapenemases variem geograficamente, essas enzimas já se encontram globalmente disseminadas (LEE et al., 2016). A crescente prevalência de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) têm sido relatada com endemicidade nos Estados Unidos e na Grécia, sendo uma das principais fontes de preocupação pelo mundo (Figura 2). As metallo- $\beta$ -lactamase (IMP) também têm sido relatadas, e com uma prevalência maior no sul da Europa e na Ásia. Carbapenemases do tipo OXA-48 foram identificadas principalmente em países europeus e na Índia (LEE et al., 2016; LOGAN; WEINSTEIN, 2017; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). A identificação recente dos produtores de NDM, originalmente identificados na Suécia em 2008, também tornou-se motivo de preocupação mundial (LEE et al., 2016). No Brasil, os primeiros casos de bactérias produtoras de carbapenemases ocorreram em *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 e foram registradas em 2009, nas cidades de Recife e Rio de Janeiro (MONTEIRO et al., 2009; PEIRANO et al., 2009). No entanto, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, foi detectado em 2013 o primeiro caso de produtores de NDM identificado em um isolado de *Providencia rettgeri* (ANVISA, 2013; PINTO et al., 2014). As bactérias produtoras de carbapenemases do tipo KPC e NDM, do ponto de vista epidemiológico são as mais preocupantes, pois possuem rápida e ampla disseminação mundial (ANVISA, 2013; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; PINTO et al., 2014).

Figura 2 – Distribuição epidemiológica de KPC no mundo



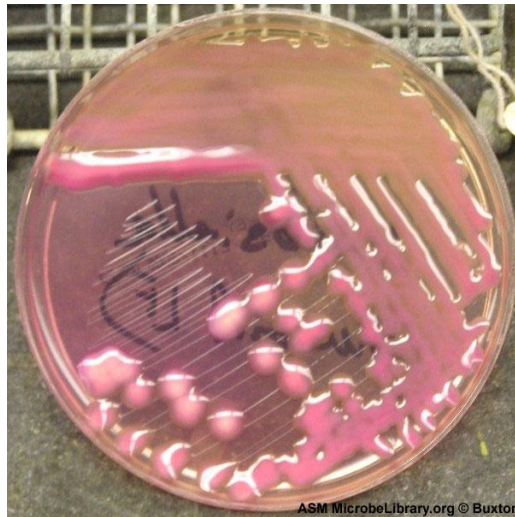
Fonte: Adaptado de Lee et al. (2016).

### 1.1 FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*

Membros da família *Enterobacteriaceae* fazem parte da microbiota intestinal e estão entre os principais patógenos mais comuns de doenças em seres humanos, ocasionando infecções como septicemia e pneumonia. São fontes de infecções comunitárias e hospitalares, sendo isolados com grande frequência em amostras biológicas. Podem se espalhar facilmente através do contato, alimentos e água contaminados ou por transferência de genes (MARTINEZ et al., 2004; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Entre os representantes desta família encontram-se os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*. Possuem características comuns, como a capacidade de fermentar glicose; de reduzir nitratos a nitritos; catalase positivos; oxidase negativos; crescerem rapidamente em meios não seletivos (ex: Ágar Sangue) ou seletivos (ex: Ágar MacConkey); serem móveis ou imóveis; aeróbicos, anaeróbicos ou anaeróbicos facultativos; fermentar ou não a lactose; possuir cápsula e fimbrias (Figura 3) (MARTINEZ et al., 2004).

Figura 3 – Crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em ágar McConkey



Fonte: <http://microbitosblog.com/2010/06/14/morfologia-colonial-bacteriana/> (acesso em 10/05/2017).

*K. pneumoniae* e *E. coli* são membros desta família e encontram-se como agentes significativos de infecções hospitalares (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). *K. pneumoniae* é um patógeno ubíquo, podendo colonizar superfícies mucosas de seres humanos e também ambientes naturais. É responsável por infecções oportunistas adquiridas na comunidade e hospitalar, principalmente das vias urinária e respiratória. *E. coli* é um organismo primariamente comensal, é a principal causa de bacteremia no Reino Unido, juntamente com *K. pneumoniae* (LIVERMORE et al., 2008) e provoca infecções sistêmicas graves com altas taxas de mortalidade (BRUCHMANN et al., 2015). *K. pneumoniae* adquiriu diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, dentre os quais a produção de carbapenemases, enzima capaz de degradar os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos utilizados no tratamento dessas infecções (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

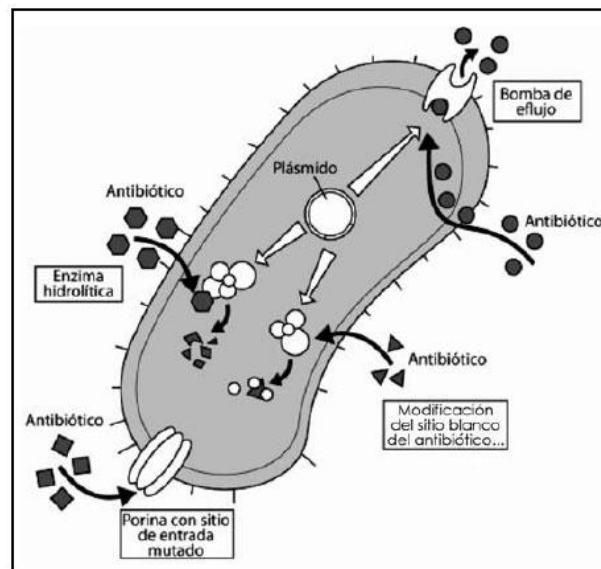
## 1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM ENTEROBACTÉRIAS

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de fármacos importantes no tratamento de infecções, devido a sua baixa toxicidade para o homem e a sua grande eficácia terapêutica (DIENSTMANN et al., 2010). Nos últimos anos, a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos tornou-se um grave problema de saúde pública. A rápida disseminação de genes e mecanismos de resistência tornou as opções terapêuticas limitadas (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Esses mecanismos estão diretamente ligados a pressão seletiva das bactérias, uso irracional dos antimicrobianos, tempo de hospitalização prolongada, diminuição ou



perdas de porinas de membrana externa da bactéria, produção de bombas de efluxo, mutações no sítio ativo do antibiótico, além da produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, capazes de hidrolisar o antimicrobiano (Figura 4) (DIENSTMANN et al., 2010; LOGAN; WEINSTEIN, 2017; MARQUEZ et al., 2014; PEIRANO et al., 2009; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; RIBEIRO et al., 2012).

Figura 4 – Tipos de mecanismos de resistência



Fonte: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-48162009000200014](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014) (Acesso em 10/05/2017).

Na família *Enterobacteriaceae*, a sensibilidade aos antimicrobianos está ligada diretamente a permeabilidade da membrana externa da bactéria. A membrana externa é a porta de defesa contra os elementos tóxicos, que ingressam nas células por meio de poros de membrana (OMPs), e assim controlam a difusão de solutos que entram através dela (NIKAIDO, 2003). A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos está relacionada com a alteração dessa permeabilidade, por diminuição ou perda da expressão das porinas mutáveis, que causam a redução da entrada do antibiótico na célula (NIKAIDO, 2003; PAGES, 2004). Nessas porinas encontram-se as proteínas, Ompk35 e Ompk36, que permitem a passagem dos antibióticos através da parede celular. As alterações dessas proteínas levam a uma produção de proteínas com atividade funcional diminuída, que interferem na conformação das porinas ou deleção das mesmas, restringindo a entrada do antibiótico e contribuindo para resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (NIKAIDO, 2003; TSAI et al., 2011). Outros mecanismos de resistência intrínsecos, natural das bactérias, incluem as bombas de efluxo que diminuem a concentração

interna dos antibióticos dentro da célula, expulsando-os para fora dela. São mecanismos de transporte ativo, codificados por plasmídeos ou transposons, que podem ser modificados dentro da célula conferindo resistência a diferentes antimicrobianos (POOLE, 2004).

As mutações no centro ativo do antibiótico é outro mecanismo de resistência encontrado nas enterobactérias, diretamente ligado na parede celular da célula bacteriana, onde os  $\beta$ -lactâmicos se unem as proteínas de ligação às penicilinas (PBPs). A alteração desses sítios, mutações nos genes PBPs que alteram a função estrutural das proteínas, acabam impedindo a capacidade de ligação dos antibióticos com os sítios de ação conferindo resistência aos antimicrobianos (NIKAIDO, 2003; PAGES, 2004).

O surgimento e disseminação de microrganismos resistentes são acelerados pela pressão seletiva que bactérias resistentes exercem sobre microrganismos susceptíveis e pelo uso pouco criterioso de agentes de amplo espectro durante a terapia clínica (KARAM et al., 2016). Mesmo que não causem problemas sérios de saúde, as bactérias podem facilmente compartilhar genes de resistência, como plasmídeos ou transposons, que são facilmente transferidos para outros gêneros bacterianos (DIENSTMANN et al., 2010). O tempo de internação e os procedimentos invasivos aumentam o risco de colonização por bactérias resistentes e causam uma predisposição à infecção por esses microrganismos (KARAM et al., 2016).

Algumas estratégias de controle da resistência exigem esforços para detecção, prevenção e controle na utilização de antimicrobianos, bem como, adoção de medidas para conter a disseminação de patógenos resistentes (ENANI, 2015). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a fim de atenuar a incidência da resistência bacteriana, publicou em 2013 uma resolução (Nº 1/2013) estabelecendo os critérios e medidas de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) por microrganismos multirresistentes (ANVISA, 2013).

Essa resolução implementa algumas medidas de restrição quanto ao uso de certas classes de antimicrobianos potencialmente associadas ao maior risco de seleção de resistência, como fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos. Além de adoção de critérios de isolamento para pacientes infectados ou colonizados por ERC, bem como medidas de higiene para os profissionais de saúde que entram em contato direto com esses pacientes, incluindo medidas de higiene no âmbito hospitalar (ANVISA, 2013).

### 1.3 CARBAPENEMASES

Nos últimos anos, os carbapenêmicos foram medicamentos utilizados para o tratamento de infecções causadas por bactérias GN. Entretanto, com o aumento da resistência aos carbapenêmicos, pela produção de enzimas carbapenemases, as opções terapêuticas tornaram-se limitadas. As carbapenemases são enzimas capazes de hidrolisar não só carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), mas as cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (MORRIL et al., 2015; PINTO et al., 2014).

A classificação molecular de Ambler para carbapenemases é baseada na sequência de aminoácidos e se divide em quatro classes A, B, C e D. Nas classes A, C e D encontram-se as serina- $\beta$ -lactamases (incluindo as do tipo KPC e OXA-carbapenemases), na qual utilizam o grupo serina no centro ativo da enzima, enquanto a classe B são das metalo- $\beta$ -lactamases (tipos IMP, VIM e NDM), que utilizam o íon zinco como cofator para atividade enzimática (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

A transmissão e o rápido desenvolvimento de surtos em ambientes hospitalares envolvendo carbapenemases ocorrem rapidamente pela disseminação plasmidial, que permite a troca de material genético entre diferentes espécies bacterianas (COTRIM et al., 2012). Dentre elas, as mais prevalentes e identificadas mundialmente, são as carbapenemases de classe A do tipo KPC, que possuem variantes bem caracterizadas (KPC-1 a KPC-22), sendo as mais prevalentes KPC-2 e KPC-3 (DIENSTMANN et al., 2010; LEE et al., 2016; TANGDEN; GISKE, 2015). Diversas carbapenemases de classe B e D também foram detectadas em *K. pneumoniae* multirresistentes adquiridas no ambiente hospitalar (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011), enquanto as carbapenemases de classe C raramente foram relatadas (LEE et al., 2016).

A propagação global de KPC tem sido atribuída a uma linhagem clonal dominante ST258, que tem se tornado um desafio para a maioria dos países, devido às opções de tratamento limitadas e elevadas taxas de mortalidade (GIANI et al., 2015). Esta bactéria pode acometer pacientes imunodeprimidos, transplantados ou submetidos a cirurgias, que se encontram na UTI e podem apresentar várias portas de entradas para infecções, como cateter venoso, sondas e feridas operatórias, facilitando a infecção por bactérias resistentes (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Segundo Munoz-Price e colaboradores (2013), KPC tem sido atribuída a surtos de infecção de corrente sanguínea, além de taxas alarmantes de mortalidade que chegam a 50%, dificultando o tratamento dessas infecções (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Del Peloso e

colaboradores (2010), relataram uma infecção generalizada por *Serratia marcescens* que carregava o gene *bla<sub>KPC</sub>*, evidenciando a disseminação de genes entre diferentes espécies de enterobactérias (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010).

As bactérias que possuem o gene *bla<sub>KPC</sub>* são responsáveis pela produção de carbapenemases e são suscetíveis apenas a alguns poucos antibióticos, como colistina, aminoglicosídeos e tigeciclina (ALVES et al., 2013; DUIN; DOI, 2015; QUEENAN; BUSH, 2007). O gene *bla<sub>KPC</sub>* em *K. pneumoniae* foi descrito em numerosos tipos de plasmídeos, incluindo os tipos IncF, IncI, IncX (GARCIA-FERNANDEZ et al., 2012; PITOUT et al., 2015). O plasmídeo IncF é o predominante, apresentando vários genes adicionais de resistência a outros antibióticos, como os aminoglicosídeos, tetraciclinas, quinolonas, trimetoprim e sulfonamidas (PITOUT et al., 2015).

A detecção de bactérias produtoras de carbapenemase em infecções clínicas são baseados em resultados de suscetibilidade antimicrobiana obtidos por sistemas automatizados, por difusão em disco, testes bioquímicos e moleculares (Reação de cadeia de polimerase-PCR) (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Testes fenotípicos de inibição utilizando ácido borônico e seus derivados tem se mostrado bastante sensíveis para a detecção de KPC em *K. pneumoniae* (TSAKRIS et al., 2010).

#### 1.4 RESISTÊNCIA À COLISTINA

O uso de colistina tem se tornado um componente chave no tratamento de infecções causadas por ERC (DUIN; DOI, 2015). Porém são crescentes os estudos que demonstram a emergência da resistência às polimixinas (FERNANDES et al., 2016; GASPAR et al., 2015; GIANI et al., 2015).

Liu e colaboradores (2016) relataram um novo mecanismo de resistência carregado por plasmídeos, o gene *mcr-1*, identificado em cepas de *E.coli* que foram isolados de animais provenientes na China (LUI et al., 2016). Recentemente no Brasil, Fernandes e colaboradores (2016), identificaram o isolamento de *E. coli* resistente à colistina em um paciente com infecção de pé diabético, que abrigava o gene *mcr-1* (FERNANDES et al., 2016). Lentz et al. (2016), também identificaram no Brasil cepas de *E. coli* que abrigavam o gene *mcr-1* em aves não expostas à polimixina (LENTZ et al., 2016).

Monaco e colaboradores (2014) relataram a grande incidência da resistência à colistina em enterobactérias produtoras de carbapenemases, em especial KPC, nos hospitais da Grécia e Itália (MONACO et al., 2014). Esses achados são de grande importância, pois demonstram

a crescente incidência da resistência antimicrobiana em todo o mundo, e a preocupação com as novas alternativas de tratamento para com esses patógenos resistentes, em virtude da escassez de novos fármacos em desenvolvimento (DOUMITH et al., 2016).

## 1.5 MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARBAPENEMASES

A detecção de bactérias produtoras de carbapenemase em infecções hospitalares é baseada primeiramente nos resultados dos testes de suscetibilidade obtidos por sistemas automatizados (Vitek<sup>®</sup> 2) ou por difusão em disco (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Os métodos de identificação fenotípica por difusão em disco são baseados na inativação e/ou inibição dessas enzimas (PICÃO et al., 2008; YONG et al., 2002). Por essas enzimas necessitarem de cátions divalentes no sítio ativo para atuarem adequadamente, elas podem ser inibidas por agentes quelantes, como o EDTA, potencializadas por oxacilinas (OXA) ou bloqueadas pelo ácido fenilborônico (AFB) (Figura 5) (PICÃO et al., 2008).

O teste de difusão em disco utilizando o ácido borônico e seus derivados é específico para detecção de KPC em *K. pneumoniae* (GISKE et al., 2011). Este método de triagem enzimático possui elevada sensibilidade (99%) (ANVISA, 2013), mas alguns problemas de especificidade podem surgir em isolados com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

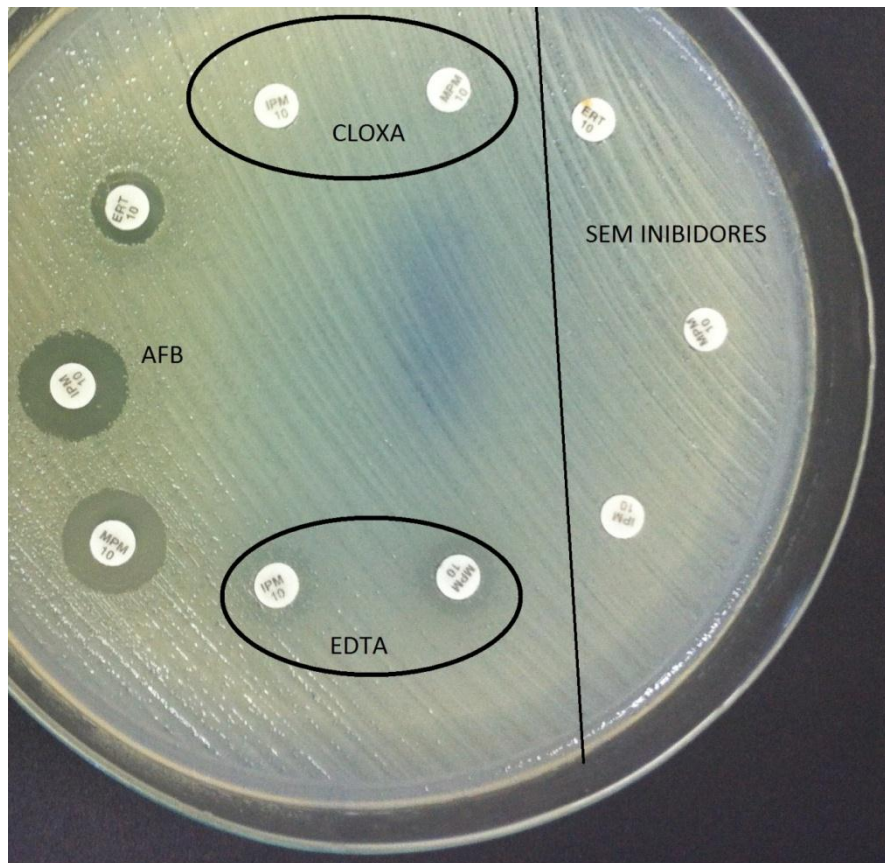
Outros métodos de identificação de carbapenemases que podem ser utilizados para identificação são: testes de sensibilidade quantitativo como o E-test<sup>®</sup>, bioquímicos como o Carba NP (NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012), Blue Carba (PIRES et al., 2016) e sistemas de identificação mais modernos como os de espectrometria de massa (MALDI-TOF), baseados em técnicas de ionização e detecção biomolecular (SANTOS et al., 2013).

O método de detecção de carbapenemase por Blue-Carba foi sugerido por Pires, Novais e Peixe (2013), e se baseia na detecção da acidificação resultante da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico do imipenem, no qual ocorre a mudança de coloração da solução por meio do indicador azul de bromotimol. Este indicador possui faixa ampla de pH (6.0 a 7.6) para a maioria das  $\beta$ -lactamases (pH = 6.8), o que torna capaz a detecção de cepas produtoras de carbapenemases. A atividade da enzima carbapenemase será detectada pela mudança de coloração da solução de azul para amarelo ou verde. Este método apresenta 100% de sensibilidade e especificidade na detecção de cepas produtoras de carbapenemases (PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013).

O método padrão ouro para identificação e diferenciação de genes de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>) se baseia na utilização de testes moleculares, como a Reação de cadeia de polimerase (PCR). A identificação genotípica por PCR é um método que possui elevada sensibilidade e especificidade, porém, apresenta desvantagens como seu alto custo, bem como maior demanda de equipamentos e pessoas com conhecimento na área para interpretar os resultados moleculares, dificultando sua utilização na rotina laboratorial (COTRIM et al., 2012; NORDMANN et al., 2012).

A detecção da resistência aos carbapenêmicos nos laboratórios clínicos tem sido bastante questionada, devido a dificuldades no manuseio de métodos automatizados para identificação desses microrganismos resistentes e problemas nos testes de sensibilidade com falsa resistência e falsa sensibilidade para o imipenem e meropenem (BABAY et al., 2011; FRANKLIN; LIOLIOS; PELEG, 2006).

Figura 5 – Teste fenotípico de difusão em disco utilizando inibidores  $\beta$ -lactamases: AFB- detecção KPC/ EDTA- produtores de MBL/ AFB + CLOXA- produtores AmpC plasmidial



Fonte: Danielly Silva/ Autora 2017.

## 1.6 OPÇÕES DE TRATAMENTO

Vários estudos observaram que a terapia combinada utilizando carbapenêmicos com outros antimicrobianos tem sido bastante eficaz no tratamento de infecções graves por ERC, reduzindo assim as taxas de mortalidade em comparação com a monoterapia (MORRIL et al., 2015).

A escolha do fármaco e as opções de tratamento utilizados devem ser baseadas primeiramente, no perfil de suscetibilidade do antimicrobiano sugerido para as ERC detectadas em cada região, visto que esse perfil pode mudar geograficamente. O local da infecção, tempo de internação e a duração desses medicamentos combinados são fatores importantes no sucesso da terapia clínica (ANVISA, 2013).

Para o tratamento de infecções por ERC recomenda-se a utilização de polimixinas B ou E (colistina) associado com fosfomicina, aminoglicosídeos, tigeciclina ou carbapenêmicos (ANVISA, 2013; MORRIL et al., 2015).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial. A rápida disseminação de ERC e seus diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos limitam as opções terapêuticas e implicam em um crescente número de casos de infecções e mortes.

Dessa forma, torna-se necessário a identificação dessas bactérias multirresistentes pelo laboratório, através de testes fenotípicos para o isolamento imediato do paciente. Em continuidade, a realização de testes genotípicos para caracterização do tipo de gene envolvido, para complementar os dados epidemiológicos. Isso culminará na adoção de medidas rigorosas de prevenção e controle de infecções para estes tipos de microrganismos.

## 1.8 OBJETIVOS

### 1.8.1 Objetivo geral

Avaliar isolados clínicos de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria/RS, no período de um ano (julho de 2014 a julho de 2015).

### 1.8.2 Objetivos específicos

- Avaliar através de método fenotípico utilizando o ácido fenilborônico (AFB), cloxacilina (CLOXA) e ácido etilenoaminotetrácético (EDTA) as amostras resistentes aos carbapenêmicos suspeitas de serem produtoras de carbapenemases tipo KPC, MBL e OXA;
- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> 2 (BioMérieux, France);
- Avaliar através do teste bioquímico Blue Carba as amostras resistentes aos carbapenêmicos suspeitas de serem produtoras de carbapenemases tipo KPC, MBL e OXA;
- Detectar por Reação de cadeia de polimerase (PCR) o gene codificador de carbapenemase do tipo *bla*<sub>KPC</sub>.



## 2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

2.1 ARTIGO 1- Phenotypic methods for screening of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CREs) and assessment of the antimicrobial susceptibility profile



**Phenotypic methods for screening of carbapenem-resistant  
Enterobacteriaceae (CREs) and assessment of the  
antimicrobial susceptibility profile**

2.2 MANUSCRITO 1- Carbapenem and Polymyxin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* (CPR-Kp), Santa Maria, Brazil

Manuscrito submetido ao periódico *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*

## 2.1 ARTIGO 1

Phenotypic methods for screening of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CREs) and assessment of the antimicrobial susceptibility profile

**Running title:** Silva DC, et al - Phenotypic methods for identification of CREs

*Danielly da Costa Silva*<sup>[1],[2]</sup>, *Roberta Filipini Rampelotto*<sup>[1],[2]</sup>, *Vinícius Victor Lorenzoni*<sup>[1]</sup>, *Silvana Oliveira dos Santos*<sup>[1],[2]</sup>, *Juliana Damer*<sup>[1],[2]</sup>, *Manfredo Hörner*<sup>[3]</sup> and *Rosmari Hörner*<sup>[1]</sup>

[1]. Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [3]. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

**ABSTRACT: Introduction:** In this study we used phenotypic methods to screen carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CREs) and evaluated their antimicrobial sensitivity profile. **Methods:** One hundred and seventy-eight CREs were isolated at a university hospital in south Brazil in a one-year period. Samples were assessed using disk diffusion tests with inhibitors of  $\beta$ -lactamases such as phenylboronic acid (AFB), cloxacillin (CLOXA), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Strains with differences in zone diameters  $\geq 5$ mm for disks supplemented or not were considered producers of carbapenemases. **Results:** *Klebsiella pneumoniae* was the most prevalent CRE, which appeared in 80.3% cases (n = 143). Among clinical materials, the rectal swab was responsible for 43.4% of the isolations (n = 62), followed by urine (18.9%; n = 27). Among the CREs identified in this study, the growth of 56.7% (n = 101) isolates, which were putative producers of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase(KPC), were inhibited by AFB, whereas 7.3% (n = 13) isolates were inhibited by both AFB and CLOXA and were considered as putative producers of plasmid-mediated AmpC; approximately 3.4% (n = 6) were inhibited by EDTA, which possibly produced metallo- $\beta$ -lactamase. Lastly, 32.6% (n = 58) cases showed negative results for AFB, CLOXA, and EDTA sensitivity, and represented another class of  $\beta$ -lactamases and/or mechanism of resistance. **Conclusions:** Phenotypic screening of CREs is important for clinical laboratories that monitor outbreaks of resistant microbes. Phenotypic tests that use carbapenemase inhibitors and enhancers such as AFB, CLOXA, and EDTA are necessary since they are good screening methods for the detection of carbapenemases.

**Keywords:** Carbapenemens. *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae*. Microbial sensitive tests. Drug resistance.

**Corresponding author:** Dra. Rosmari Hörner.

**e-mail:** [rosmari.ufsm@gmail.com](mailto:rosmari.ufsm@gmail.com)

**Received** 16 November 2016

**Accepted** 6 April 2017

## INTRODUCTION

Emergence of antibiotic-resistant bacteria is a major global public health concern, and the Gram-negative bacilli of the *Enterobacteriaceae* family are well-known for exhibiting drug-resistance. Drug-resistant microorganisms cause recurrent infections in patients in hospital units, limiting treatment alternatives and increasing morbidity and mortality rates<sup>1,2</sup>.

Since the isolation of *Enterobacteriaceae* that produce an extended spectrum of  $\beta$ -lactamases (ESBL) capable of hydrolysing almost all cephalosporins, use of carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem, and doripenem) in treating *Enterobacteriaceae* infections has become mandatory<sup>1</sup>. These antimicrobials are crucial for preventing and treating infections in high-risk patients such as those undergoing transplantation surgery or any other surgical procedure or admitted in intensive care units (ICU)<sup>1</sup>.

A wide variety of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* have been reported worldwide<sup>3, 4</sup>. Carbapenem resistance is mediated the by transfer of mobile genetic elements such as plasmids and transposons, which are easily transferred to other bacterial genera and species, i.e., *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, among others.

The mechanisms via which *Enterobacteriaceae* resists different classes of antimicrobials vary; for example, the mechanisms may be associated with the decrease or loss of porin in bacterial outer membranes (OMPs) and efflux pumps, mutations in the active site of antimicrobials that decreases their affinity for microbes, and the presence of  $\beta$ -lactamase-encoding genes<sup>3,5-7</sup>. Among the carbapenemases produced from plasmids, the Ambler class A (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-KPC and Guiana-Extended-Spectrum-GES) has been identified in clinical isolates<sup>8</sup>. The other types of carbapenemases include Ambler class B or metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) (Verona imipenemase-VIM, Imipinemase-IPM, and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-NDM) and oxacillinases or Ambler class D (Oxa-carbapenemases-OXA-48)<sup>1,3,9-11</sup>.

From the epidemiological point of view bacteria that produce KPC carbapenemase are the most worrisome owing to their rapid worldwide dissemination<sup>12</sup>. These bacteria are considered important agents of nosocomial infections because they produce carbapenemase, which is an enzyme that hydrolyzes the  $\beta$ -lactam ring of not only

carbapenem antibiotics, but also those of cephalosporins, penicillin, and monobactams<sup>13</sup>.

Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CREs) increase the morbi-mortality rates of patients, especially those admitted in hospitals or with weakened immune systems, and make therapeutic alternatives scarce<sup>14,15</sup>. In this study, we used phenotypic methods to screen carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CREs) isolated at a university hospital in South Brazil in a one-year period (July 2014 to July 2015), and evaluated their antimicrobial sensitivity profiles.

## **METHODS**

### **Study site**

The study was performed at the *Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (LaBac)* at *Centro de Ciências da Saúde de Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)*, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Samples were provided by the *Laboratório de Análises Clínicas* of the *Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)*, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

### **Samples**

One hundred seventy-eight samples of CREs were isolated between July, 2014 and July, 2015 from several biological materials, including epidemiologic vigilance research comprising patients admitted to a university hospital (HUSM) in the southern region of Brazil. Samples were subsequently sent to LaBac and subsequently stored in 15% glycerol at -80°C for further phenotypic tests.

### **Bacterial identification test**

All cultures were collected and processed per the standard operating procedure (SOP) at the *Laboratório de Análises Clínicas* of the hospital. Identification tests of the isolated bacteria were performed using the automated system, Vitek<sup>®</sup> 2 (BioMérieux, France).

### **Sensitivity profile**

Sensitivity profiles of the isolates were assessed through the automated methodology Advanced Expert System (BioMérieux, France), following recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>(16)</sup>. Sensitivity cards were used with the following antimicrobials: ertapenem, meropenem, imipenem, amikacin, gentamicin,

norfloxacin, nitrofurantoin, sulfamethoxazole/trimethoprim, ciprofloxacin, tigecycline, and colistin.

### **Phenotypic tests with phenylboronic acid, cloxacillin, and ethylenediaminetetraacetic acid**

Samples stored in 15% glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$  were reactivated in plates containing trypticase soy agar (TSA/Oxoid LTD, England), and incubated at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 18 to 24h. A bacterial suspension was subsequently prepared in 0.9% sterile saline solution, with turbidity similar to the 0.5 McFarland standard, and humidified with aswab sowed in Mueller-Hinton agar (MHA/HiMedia Laboratories, India) in  $15 \times 150\text{mm}$  plates. Next, ertapenem, meropenem, and imipenem disks (Diagnósticos Microbiológicos Especializados, Brazil) were placed on a Petri dish, supplemented with a  $10\mu\text{L}$  solution of AFB (40mg/mL, Sigma-Aldrich), CLOXA (75mg/mL, Sigma-Aldrich), or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.1mol/L, Proquimios Comércio e Indústria Ltda, Brazil), with a drying time of 20 minutes such that they could be applied on the bacterial suspension in MHA at a distance of 3cm from one another. Non-supplemented ertapenem, meropenem, and imipenem disks served for comparison with supplemented disks. In a plate there were placed non-supplemented ertapenem, meropenem, and imipenem disks; ertapenem, meropenem and imipenem disks supplemented with AFB; meropenem and imipenem disks supplemented with CLOXA; and meropenem and imipenem disks supplemented with EDTA. The plates were then incubated at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 18 to 24h<sup>(13)</sup>.

Subsequently, the difference of the inhibition zone diameter was compared between non-supplemented disks and those supplemented with AFB, CLO, or EDTA. Isolates with an inhibition zone difference  $\geq 5\text{mm}$  for ertapenem, meropenem, and imipenem disks supplemented with AFB were considered possible KPC producers. Isolates with a difference  $\geq 5\text{mm}$  for antimicrobial disks supplemented with AFB and CLOXA were considered possible producers of plasmid-mediated AmpC. Isolates with zone difference  $< 5\text{mm}$  for antimicrobial disks supplemented AFB, CLOXA and EDTA were considered possible producers of another  $\beta$ -lactamase (ex. OXA-48) or porin loss, and the ones that showed a zone difference  $\geq 5\text{mm}$  only for disks supplemented with EDTA were considered likely producers of MBL<sup>(13)</sup>.

## Ethical considerations

This study was approved by the Ethical Research Committee of the Federal University of Santa Maria under n° 0285.0.243.000-09.

## RESULTS

Among the 178 CRE samples analyzed, *Klebsiella pneumoniae* was the most prevalent microorganism (80.3%; n = 143), followed by *Enterobacter cloacae* (8.4%), *Serratia marcescens* (5.6%), *Enterobacter aerogenes* (2.2%), *Klebsiella oxytoca* (1.1%). *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Raoultella ornithinolytica*, and *Morganella morganii* accounted for 0.6% of the total isolated CREs. Most *K. pneumoniae* isolates were obtained from the rectal swab (43.4%; n = 62), which is a part of surveillance culture, followed by urine (18.9%; n = 27) and blood (10.5%; n = 15). The largest number of *E. cloacae* was isolated from tracheal secretion (33.3%; n = 5), and urine (26.7%; n = 4) and rectal swabs (13.3%; n = 2) as shown in **Table 1**.

The growth of 56.7% (n = 101) CREs, which were putative producers of KPC, were inhibited by AFB, whereas 3.4% (n = 6) were inhibited by EDTA and possibly produced MBL (e.g. NDM, IMP, VIM); further, 7.3% (n = 13) were inhibited by both AFB and CLOXA, and were putative producers of plasmid-mediated AmpC; the growth of 32.6% (n = 58) isolates were not inhibited by AFB, CLOXA, and EDTA, and possibly produced yet another type of  $\beta$ -lactamase, such as OXA-48 or porin loss (**Table 2**).

Analysis of the resistance profile of the studied isolates showed that 178 samples showed resistance to at least one carbapenem (ertapenem, meropenem, and imipenem). Among *K. pneumoniae* isolates, 97.9% (n = 140) showed resistance to ertapenem, 98.6% (n = 141) to meropenem, and 97.1% (n = 101) to imipenem, whereas *E. cloacae* and *S. marcescens* showed 86.7% and 100% resistance to ertapenem, respectively. Ciprofloxacin-resistant isolates (90%) were also detected, as shown in **Table 3**. Most *K. pneumoniae* isolates were sensitive to aminoglycosides such as amikacin (97.2%), gentamicin (50%), and colistin (73.5%). Only *E. cloacae* showed low sensitivity to gentamicin in 21.4% (n = 3) samples.

## DISCUSSION

The prevalence of CREs has increased worldwide, which represents an alarming threat to public health<sup>15</sup>. In this study, we showed that a large incidence of *K. pneumoniae* was detected in the analyzed samples, and the rectal swab, a surveillance culture, was the clinical material with the maximum number of isolates (43.4%). The most frequent carbapenemase detected in rectal swab isolates was KPC (64.5%). Similar results were reported by Pinto et al<sup>15</sup>, who assessed 701 CREs isolated from hospitals in Porto Alegre, in which 47% cases were represented by *K. pneumoniae*, and 66% of these were KPC producers. In addition, 51.7% samples with CREs were from rectal swabs, which corroborated the results of our study<sup>15</sup>. Singh et al. (2015)<sup>12</sup> evaluated 73 samples from various clinical specimens like urine, pus, swabs, body fluids, among others, in India, of which 41.1% (n = 30) were KPC-producing *K. pneumoniae* (via the AFB test), which is similar to the results reported in this study where 56.7% clinical isolates were found to be KPC-positive using the same test.

Among the isolated CREs, 58 (32.6%) were carbapenem-resistant but were not positive in any phenotypic tests, indicating the presence of another type of  $\beta$ -lactamases as a resistance mechanism (e.g. OXA-48 or porin loss). This was the second-most frequent resistance mechanism identified in our study. Since the global frequency of occurrence of this class of carbapenem-resistant bacteria is still low (which corroborates the results of Pinto et al.<sup>15</sup>), a detailed investigation into alternative mechanisms of resistance is required to control the dissemination of such strains in future.

The majority of the isolates showed decreased sensitivity to carbapenems, which are the most commonly used therapeutic choices against these infections<sup>1</sup>. The isolates identified in this study showed increased resistance to carbapenems, quinolones, and glycyliclins, which is similar to that shown by Hayder et al.<sup>17</sup>, where isolates producing KPC showed 100% resistance to carbapenems, cephalosporins, quinolones, and penicillin. Our results also in agreement with those reported by Singh et al.<sup>12</sup>, where the greatest resistance was observed for third generation cephalosporins (100%) and penicillin (93.3%). In addition, Singh et al.<sup>12</sup> have verified increased sensitivity to tigecycline (86.7%) and polymyxin (93.3%), which is different from the results of our study as we observed greater sensitivity to aminoglycosides and colistin.

However, 32 strains isolated in this study were resistant to colistin, which is an antimicrobial used in the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria.

Liu<sup>18</sup>, observed that the resistance to colistin is mediated by plasmids in *K. pneumoniae* and *E. coli* in China, and colistin-resistant bacteria were found in animals and isolated from humans. It is important to highlight that polymyxin B or colistin are used for the treatment of infections caused by CREs and are associated with one or more antimicrobials such as aminoglycosides (gentamicin or amikacin), carbapenems, and tigecycline<sup>19,20</sup>. This increases the concern associated with the indiscriminate use of these drugs in treating nosocomial infections and in veterinary medicine<sup>18</sup>.

The phenotypic detection of CREs is of great importance for clinical laboratories and for monitoring the emergence of resistant bacterial strains. The fast dissemination of genes and mechanisms of resistance to antimicrobials limits therapeutic options and increases the morbi-mortality of patients<sup>15</sup>. Therefore, phenotypic tests that use inhibitors and enhancers of carbapenemases such as AFB, CLOXA, and EDTA are necessary since they provide a good screening method for detection of carbapenemases. In addition, these methods are easy to adapt in the laboratory routine. However, the results obtained from these phenotypic tests should be confirmed by further molecular tests, if required, for identifying resistant strains.

### **Limitations of the study**

This research presented limitations in terms of non-detection of other resistance mechanisms (OXA, MBL), which could interfere with sensitivity and specificity. In addition, the molecular tests were not performed to confirm the presence of the enzymes.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest.

### **REFERENCES**

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *E Inf Dis*. 2011;17(10):1791-98.
2. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated  $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1295-1302.



3. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antim Ag Chem*. 2015;59:5873-84.
4. Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CMT, Primo MGB, Batista LJA. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. *Rev Assoc Med Bras*. 2007;53(1):34-8.
5. Dienstmann R, Picoli SU, Meyer G, Schenkel T, Steyer J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(1):23-7.
6. Ribeiro VB, Zavascki AP, Nodari CS, Sandri AM, Silva MP, Campos JC, et al. Detection of bla<sub>KPC-2</sub> in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. *J Antim Chem*. 2012;67(11):2776-7.
7. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;3(10):62-70.
8. Singh M, Kakati B, Agarwal RK, Kotwal A. Detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs) among ESBL/MBL producing clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Curr Microbiol AppSci*. 2015;4(4):726-31.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Document M100-S24. Wayne: CLSI; 2014.
10. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antim Agents and Chemother*. 2010;54(3):969-76.
11. Hayder N, Hasan Z, Afrin S, Noor R. Determination of the frequency of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Dhaka city, Bangladesh. *Stamford. J Microbiol*. 2012;2(1):28-30.
12. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *E Inf Dis*. 2012;18(9):1503-7.
13. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol*. 2004;155(6):409-21.
14. Papadimitriou-Olivgeris M, Christofidou M, Fligou F, Bartzavali C, Vrettos T, Filos KS, et al. The role of colonization pressure in the dissemination of colistin or tigecycline resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients. *Infect*. 2014;42(7):883-90.
15. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Inf*. 2014;20(9):862-72.
16. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):160-201.
17. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. *Gut Path*. 2014;6(13):1-7.

18. Pinto FM, Simas DM, Baldin CP, Limberger II, Silva RCF, Antchevis LC, et al. Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. *Clin Biomed Res*. 2014;34(1):47-52.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica 01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. Brasília: ANVISA; 2013.
20. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Inf Dis*. 2016;16(2):161-8.

**TABLE 1. Distribution of 178 CREs\* isolated at the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) from July 2014 to July 2015.**

Clinical supplies	Microorganisms								
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>M. morgani</i>	<i>R.ornithinolytica</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>E. coli</i>
Swab rectal (Surveillance culture)	43.4% (n = 62)	13.3% (n = 2)	10% (n = 1)	75% (n = 3)	-	-	100% (n = 1)	100% (n = 1)	-
Urine	18.9% (n = 27)	26.7% (n = 4)	20% (n = 2)	25% (n = 1)	-	100% (n = 1)	-	-	-
Blood	10,5% (n = 15)	6,7% (n = 1)	40% (n = 4)	-	-	-	-	-	100% (n = 1)
Tracheal secretion	7.7% (n = 11)	33.3% (n = 5)	20% (n = 2)	-	50% (n = 1)	-	-	-	-
Sputum	4.1% (n = 6)	13.3% (n = 2)	10% (n = 1)	-	50% (n = 1)	-	-	-	-
Abdominal fluid	3.5% (n = 5)	-	-	-	-	-	-	-	-
Catheter tip	2.1% (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-	-
Peritoneal fluid	1.4% (n = 2)	-	-	-	-	-	-	-	-
Wound Secretion	0.7% (n = 1)	6.7% (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
Others*	7.7 (n = 11)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>143</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

\*Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *S. marcescens*: *Serratia marcescens*; *E. aerogenes*: *Enterobacter aerogenes*; *K. oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*; *M. morgani*: *Morganella morgani*; *R. ornithinolytica*: *Raoultella ornithinolytica*; *E. coli*: *Escherichia coli*; -: not done\* Muscle tissue; ear secretion; bone tissue; secretion penrose; intraperitoneal secretion; subcutaneous secretion; abdominal aponeurosis; intra-abdominal abscess; swab calcaneus; ascites; peri-prosthetic secretion.

**TABLE 2. Distribution of CREs in clinical specimens and the resistance mechanism obtained in phenotypic tests.**

Microorganism	Source	AFB	AFB + CLOXA	EDTA	Other mechanism
<i>K. pneumoniae</i> (n = 143)	Swab rectal	64.5% (n=40)	9.7% (n = 6)	-	25.8% (n = 16)
	Urine	70.4% (n=19)	3.7% (n = 1)	-	25.9% (n = 7)
	Blood	53.3% (n=8)	26.7% (n = 4)	-	20% (n = 3)
	Tracheal secretion	81.8% (n=9)	-	-	18.2% (n = 2)
	Sputum	50% (n = 3)	-	-	50% (n = 3)
	Abdominal fluid	100% (n=5)	-	-	-
	Catheter tip	100% (n=3)	-	-	-
	Peritoneal fluid	100% (n=2)	-	-	-
<i>E. cloacae</i> (n = 15)	Others*	83.3% (n=10)	8.3% (n = 1)	-	8.3% (n = 1)
	Tracheal secretion	-	-	20% (n = 1)	80% (n = 4)
	Urine	-	-	-	100% (n = 4)
	Swab rectal	-	-	-	100% (n = 2)
	Sputum	-	-	50% (n = 1)	50% (n = 1)
	Blood	-	-	-	100% (n = 1)
	Secretion wound	-	-	-	100% (n = 1)
	Blood	-	-	50% (n = 2)	50% (n = 2)
<i>S. marcescens</i> (n = 10)	Urine	-	-	-	100% (n = 2)
	Tracheal secretion	-	-	-	100% (n = 2)
	Swab rectal	-	-	-	100% (n = 1)
	Sputum	-	-	-	100% (n = 1)
<i>E. aerogenes</i> (n = 4)	Swab rectal	-	-	-	100% (n = 3)
	Urine	-	-	-	100% (n = 1)
<i>K. oxytoca</i> (n = 2)	Sputum	100% (n=1)	-	-	-
	Tracheal secretion	-	100% (n = 1)	-	-
<i>M. morgani</i> (n = 1)	Urine	-	-	-	100% (n = 1)
<i>R. ornithinolytica</i> (n=1)	Swab rectal	-	-	100% (n = 1)	-
<i>Salmonella spp.</i> (n=1)	Swab rectal	100% (n=1)	-	-	-
<i>E. coli</i> (n= 1)	Blood	-	-	100% (n = 1)	-
<b>Total</b>	n = 178	56.7% (n = 101)	7.3% (n = 13)	3.4% (n = 6)	32.6% (n = 58)

*K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *S. marcescens*: *Serratia marcescens*; *E. aerogenes*: *Enterobacter aerogenes*; *K. oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*; *M. morgani*: *Morganella morgani*; *R. ornithinolytica*: *Raoultella ornithinolytica*; *E. coli*: *Escherichia coli*; **AFB**: phenylboronic acid; **KPC**: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ; **AFB + CLO**: phenylboronic acid+ cloxacillin; **EDTA**: ethylenediaminetetraacetic acid; **MBL**: metallo- $\beta$ -lactamases; **OXA**: oxacillinases. \*Secretion of wound; muscle tissue; ear secretion; bone tissue; secretion penrose; intraperitoneal secretion; subcutaneous secretion; abdominal aponeurosis; Intra-abdominal abscess; swab calcaneus; ascites; peri-prosthetic secretion; **AFB**: possible KPC-producing; **AFB + CLO** = possible plasmidial AmpC-producing; **EDTA** = possible MBL-producing; Other mechanism = production of other  $\beta$ -lactamase (e.g., OXA-48) or porin loss.

TABLE 3. Resistance profile and sensitivity of *Enterobacteriaceae* isolated in the study.

Antibiotics	Erta		Mero		Imi		Amic		Gen		Nor		Nitro		Sulf		Cipro		Tig		Col	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
<i>K. pneumoniae</i>	97,9% (n=140)	2,1% (n=3)	98,6 (n=141)	1,4% (n=2)	97,1% (n=101)	0,9% (n=1)	2,1% (n=3)	97,2% (n=138)	48,6% (n=68)	50% (n=70)	90,2% (n=37)	7,3 (n=3)	92,8 (n=39)	2,4% (n=1)	80,5% (n=33)	19,5% (n=8)	90,0% (n=127)	6,4% (n=9)	68% (n=68)	13% (n=13)	26,5% (n=27)	73,5% (n=75)
<i>E. cloacae</i>	86,7% (n=13)	13,3% (n=2)	86,7% (n=13)	13,3% (n=2)	81,8% (n=9)	-	13,3% (n=2)	86,7% (n=13)	78,6% (n=11)	21,4% (n=3)	100% (n=4)	-	75% (n=3)	-	100% (n=4)	-	80% (n=12)	20% (n=3)	72,7% (n=8)	18,2% (n=2)	9,1% (n=1)	90,9% (n=10)
<i>S. marcescens</i>	100% (n=10)	-	100% (n=10)	-	100% (n=6)	-	-	100% (n=10)	-	100% (n=10)	-	100% (n=3)	100% (n=2)	-	-	100% (n=3)	10% (n=1)	80% (n=8)	60% (n=3)	-	100% (n=3)	-
<i>E. aerogenes</i>	100% (n=4)	-	100% (n=4)	-	100% (n=2)	-	-	100% (n=4)	-	100% (n=4)	-	100% (n=2)	50% (n=1)	50% (n=1)	-	100% (n=2)	25% (n=1)	50% (n=2)	100% (n=2)	-	-	100% (n=2)
<i>K. oxytoca</i>	100% (n=2)	-	100% (n=2)	-	100% (n=2)	-	-	100% (n=2)	50% (n=1)	50% (n=1)	-	-	-	-	-	-	50% (n=1)	-	-	-	-	100% (n=2)
<i>M. morgani</i>	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	-	-
<i>R.ornithinolytica</i>	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	100% (n=1)	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	100% (n=1)	-
<i>Salmonella spp</i>	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	100% (n=1)	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)	-	100% (n=1)

*K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *S. marcescens*: *Serratia marcescens*; *E. aerogenes*: *Enterobacter aerogenes*; *K. oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*; *M. morgani*: *Morganella morgani*; *R. ornithinolytica*: *Raoultella ornithinolytica*; *E. coli*: *Escherichia coli*; **Erta**: ertapenem; **Mero**: meropenem; **Imi**: imipenem; **Amic**: amikacin; **Gen**: gentamicin; **Nor**: norfloxacin; **Nitro**: nitrofloxacina; **Sulfonic**: trimethoprim/sulfamethoxazole; **Cipro**: ciprofloxacina; **Tig**: tigecyclina; **Col**: colistin; **R**: resistant; **S**: sensitive; **-**: not performed.

## 2.2 MANUSCRITO 1

**Carbapenem and Polymyxin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* (CPR-Kp), Santa Maria, Brazil**

Danielly da Costa Silva<sup>a</sup>, Vinícius Victor Lorenzoni<sup>a</sup>, Roberta Filipini Rampelotto<sup>a</sup>, Patrícia Chaves Brites<sup>b</sup>, Rosmari Hörner<sup>a,c\*</sup>.

<sup>a</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Santa Maria, RS, Brazil.

\*Corresponding author:

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - DACT- Avenida Roraima, número 1000 - Prédio 26 - salas 1201/1205 - Fone: 55 3220 8751/ 55 9111 9691- FAX: 55 3220 1880 - CEP: 97105-900

Dear Editor,

We are submitting the study entitled “Carbapenem and Polymyxin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* (CPR-Kp), Santa Maria, Brazil” to your journal as a letter to the editor. The relevance of this study is due to the fact that it was the first study performed in this hospital aiming to report resistance to colistin in Gram-negative bacilli of the *Enterobacteriaceae* family, which we have only detected in *Klebsiella pneumoniae*. The frequent use of carbapenems in the treatment of patients with underlying diseases has allowed the development of resistance to this class of drugs. Hence, there was the return to polymyxins B and E (colistin), as well as tigecycline and aminoglycosides. However, there are an increasing number of studies showing the emergence of resistance to polymyxins. So far, broth microdilution is the only acceptable laboratory method used

to assess sensitivity to polymyxins. We would like to inform that this study meets the ethical requirements for research with human subjects and is approved by the Research Ethics Committee (CEP) of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) under the protocol number 38850614.4.0000.5346.

We would like to thank you for your willingness to evaluate our study.

### **Carbapenem and Polymyxin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* (CPR-Kp), Santa Maria, Brazil**

To the Editor,

Emerging threat:

Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* are associated with high mortality rates, and polymyxins are considered the last resort for treatment.<sup>1</sup> Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-Kp) are endemic in Brazil and are frequently related to infections in patients admitted to Intensive Care Units (ICU).<sup>1-2</sup> *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenem and polymyxin (CPR-Kp) have been reported worldwide and its treatment consists of an emerging threat. In Brazil polymyxins have been used as the last resource to treat infections caused by CR-Kp, in addition to tigecycline and aminoglycosides.<sup>2</sup> However, the fast worldwide dissemination of resistance to polymyxin B and colistin has been reported.<sup>1-2</sup>

A prospective study was performed between July 2014 and July 2015 assessing carbapenem and colistin-resistant isolates from several clinical specimens of patients admitted to a teaching hospital in the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil. Identification and antimicrobial sensitivity profile tests were performed through the automated system Vitek<sup>®</sup>2 (BioMérieux), and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), being considered resistant the specimens with intermediary and/or resistant profile. Phenotypic tests of disk diffusion with phenylboronic acid (PBA) were performed according to the Technical Note nº 01/2013 (ANVISA) as well as Blue-Carba,<sup>3</sup> and molecular tests through polymerase chain reaction (PCR) *simplex* (*bla<sub>KPC</sub>*). One-hundred seventy-two isolates of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* were obtained, being 139 (80.8%) *Klebsiella pneumoniae*,

14 (8.1%) *Enterobacter cloacae*, 10 (5.8%) *Serratia marcescens*, and 9 (5.3%) other species. The *bla<sub>KPC</sub>* gene was detected in 124 isolates (72.1%). One-hundred eleven (64.5%) and 121 (70.3%) of *K. pneumoniae* isolates were carbapenemase producers through disk diffusion (PBA) and Blue-Carba, respectively. Considering PCR as the gold standard for this resistance mechanism, PBA has evidenced 80% sensitivity and 75% specificity, data similar to the ones obtained by Giske et al.<sup>4</sup> The prevalent age group was 51-78 years old, with a predominance of males, 61%. The main source of the isolates was rectal swab (surveillance culture) with 48 isolates (34.5%). Resistance to colistin was identified in 25 isolates of CR-Kp, with 10 patients (7.2%) dying by CR-Kp strains, and 3 (2.2%) by CPR-Kp. The dissemination of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* has led to the increase of use of polymyxins in infected patients in hospitals.<sup>5</sup> Polymyxin B and colistin show satisfactory effectiveness in the treatment of infections caused by CR-Kp, since CPR-Kp can disseminate horizontally. It is documented that the prolonged use of antibiotic therapy and the previous colonization by strains susceptible to polymyxin B in hospitalized patients can cause resistance in CR-Kp.<sup>5</sup> Our results have shown an alarming rate of CPR-Kp in this tertiary hospital, with approximately 18% of the isolates positive to the *bla<sub>KPC</sub>* gene. We ratify the importance of the prompt and precise identification of CR-Kp and CPR-Kp isolates since they have a high transfer potential through plasmids for *K. pneumoniae* as well as other multiresistant bacteria.

This work was supported by a grant from the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Santa Maria, Brazil.



## References

- 1-Karam G, Chastre J, Wilcox MH, et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care*.2016; 20:136.
- 2-Bartolleti F, Seco BMS, Santos CC, et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*.2016; 22: 1849-1851.
- 3-García-Fernández S, Morosini MI, Gijón D, et al. Detection of Carbapenemase Production in a Collection of *Enterobacteriaceae* with Characterized Resistance Mechanisms from Clinical and Environmental Origins by Use of Both Carba NP and Blue-Carba Tests. *Journal of Clinical Microbiology*.2016; 54:464-466.
- 4-Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*.2011; 17:552-556.
- 5-Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Andrade LN, et al. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.2015; 48:483-487.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS ADICIONAIS

#### 3.1 DETECÇÃO FENOTÍPICA BLUE-CARBA

Foram utilizadas dois poços para cada cepa analisada numa microplaca de 96 poços contendo 100 µL de solução controle (azul de bromotimol e sulfato de zinco heptahidratado 0,1 mM/L a pH 7,0) e 100 µL da solução teste (6mg/mL de imipenem e 1mL da solução controle). Foram inoculados em cada poço 5 µL da cepa, previamente cultivada em TSA. As microplacas foram acondicionadas a 35 °C em estufa bacteriológica, observando a coloração dos poços a cada 15 minutos pelo período de 2 horas.

As cepas foram consideradas produtoras de carbapenemase quando houve mudança de coloração da solução teste, de azul para amarelo/verde e quando a coloração do poço controle permaneceu azul. Resultados para KPC foram observados entre 2 a 30 minutos; 30 minutos à 1 hora para MBL e 1 a 2 horas para OXA (PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013).

#### 3.2 TESTE MOLECULAR

##### 3.2.1 Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA)

Para realização da técnica de PCR, foram utilizadas cepas de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, provenientes de pacientes admitidos no HUSM, entre os meses de julho de 2014 a julho de 2015, as quais se encontravam armazenadas em glicerol 15% a temperatura de – 80°C na bacterioteca do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM.

A extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) foi realizada conforme Pérez-Pérez e Hanson (2002). As cepas armazenadas a -80° C em TSB com 15% de glicerol foram repicadas em placas de *petri* contendo TSA, e foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Após o crescimento das colônias, com auxílio de uma alça bacteriológica, foram transferidas para tubos de *ependorf* livres de DNase/RNase de 1,5 mL contendo 100µl de tampão TE (10 mMTris, 1mM de EDTA, pH 8). Posteriormente, os tubos foram homogeneizados em agitador vórtex durante 5 a 10 segundos e aquecidos em termobloco a 100 °C durante 10 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, em cada *ependorf* foram adicionados 900 µL de água ultra-pura, os quais foram homogeneizados em agitador vórtex durante 5 a 10 segundos. Após, os mesmos foram submetidos à centrifugação a 12000 rpm

durante 10 minutos. Separou-se então o sobrenadante, equivalente ao DNA bacteriano. As amostras foram armazenadas no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização da técnica da PCR (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

### 3.2.2 Detecção do gene $BLA_{KPC}$

A detecção do gene  $bla_{KPC}$  (YIGIT et al., 2001) foi realizado através de PCR simplex. Para o gene  $bla_{KPC}$  foi utilizado a sequência de *primers* KPC-F (5'-TCGCTAAACTCGAA CAGG-3') e KPC-R (5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3').

As condições dos ciclos térmicos nas reações de amplificação para KPC foram desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, 35 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos, extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (YIGIT et al., 2001).

### 3.2.3 Considerações éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) sob o número 38850614.4.0000.5346.

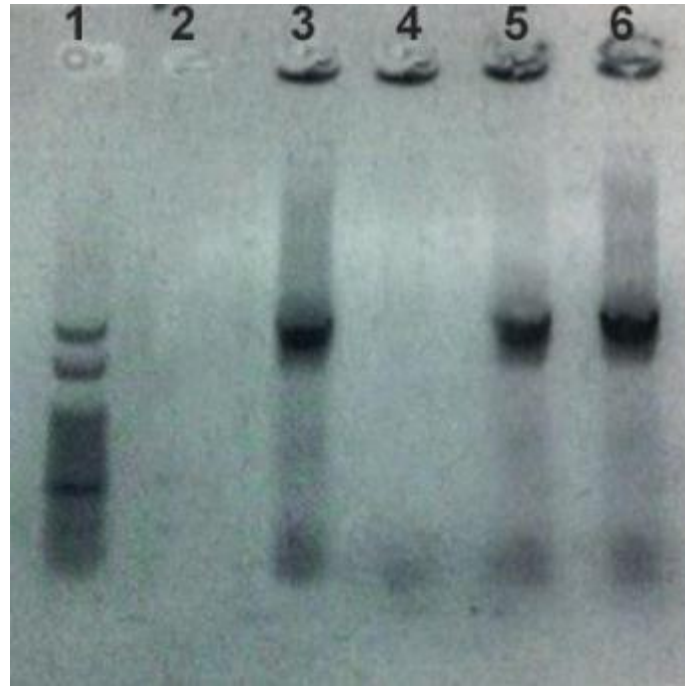
#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES ADICIONAIS

Dentre as bactérias GN, a produção de carbapenemase é um dos mecanismos mais comuns de resistência encontrada na UTI, na qual está associada cada vez mais a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (KARAM et al., 2016; LOGAN; WEINSTEIN, 2017). Infecções por ERC estão associadas a altas taxas de mortalidade e as polimixinas constituem último recurso para o tratamento (KARAM et al., 2016). A crescente prevalência de KPC resistente as polimixinas têm se tornado uma ameaça global (BARTOLLETTI et al., 2016).

Neste estudo foram analisadas 172 amostras de ERC, sendo *K. pneumoniae* o microrganismo prevalente, 139 (80,81%). O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi detectado em 124 (72,09%) isolados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 6). Pela técnica de difusão em disco utilizando o AFB, 111 (64,53%) foram produtores de KPC e pelo Blue-Carba 121 (70,34%) isolados (Figura 7). Considerando a PCR como método padrão ouro, as técnicas fenotípicas evidenciaram 80% de sensibilidade e 75% de especificidade, e 90% de sensibilidade e 81% de respectivamente. Giske e colaboradores (2011) constataram 100% de sensibilidade e 98% de especificidade utilizando AFB na detecção de KPC em *K. pneumoniae*, resultados similares ao deste estudo. Assim como García-Fernández (2016), que constataram 98% de sensibilidade e 100% de especificidade utilizando o Blue-Carba para detecção de KPC.

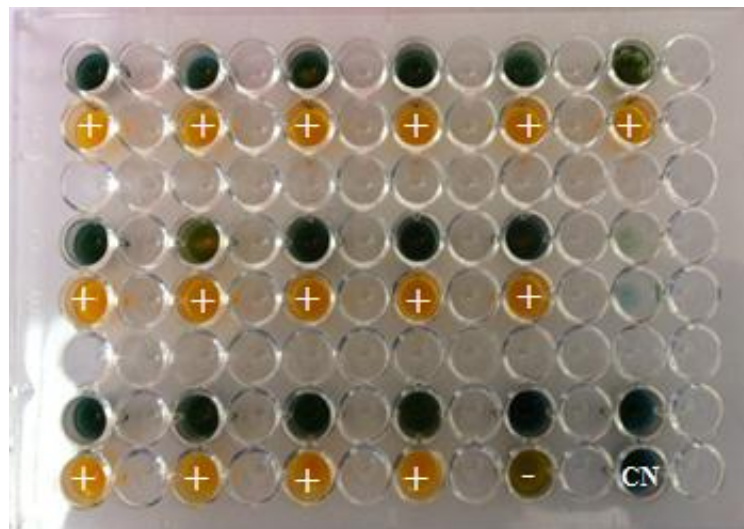
Ainda, nosso estudo evidenciou a resistência à colistina identificada em 25 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (CR-Kp), sendo que 10 (7,19%) pacientes evoluíram a óbito por isolados CR-Kp e três (2,16%) por amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e a colistina (CPR-Kp). Assim como Gaspar e colaboradores (2015), que relataram a colonização de pacientes por polimixina resistente em KPC, no qual avaliaram que o uso prévio deste antimicrobiano no tratamento das infecções e a transferência horizontal de genes é um fator importante para resistência a esse fármaco. Nosso estudo apresentou uma taxa alarmante de CPR-Kp, aproximadamente 18% das amostras positivas para o gene *bla<sub>KPC</sub>*, o que torna esses dados preocupantes, visto que esses genes são facilmente transferidos para outras espécies bacterianas e este fármaco é a última escolha para o tratamento dessas infecções por microrganismos multirresistentes.

Figura 6 – Identificação através da PCR para detecção do gene *bla<sub>KPC</sub>*



1: Padrão de peso molecular; 2: Branco; 3: Controle KPC; 4: Controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); 5 e 6: amostras positivas para o gene *bla<sub>KPC</sub>*.

Figura 7 – Resultados através da metodologia Blue-Carba



+: Amostras positivas para KPC; - : Amostra negativa para KPC; CN: Controle negativo.

## 5 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados apresentados nesta dissertação, em forma de publicações científicas, pode-se concluir que:

- Em relação à produção de carbapenemases, 101 (56,7%) das ERCs isoladas foram de *K. pneumoniae* possíveis produtores de KPC, inibidas por AFB;

- 6 (3,4%) foram possíveis produtoras de MBL (NDM, IMP, VIM) inibidas por EDTA;

- 13 (7,3%) foram possíveis produtores de AmpC plasmidial, inibidas tanto por AFB quanto por CLOXA;

- 58 (32,6%) dos isolados foram resistentes aos carbapenêmicos, não sendo positivos pelos testes fenotípicos com AFB, CLOXA e EDTA, e dessa forma, possivelmente produtores de outro tipo de  $\beta$ -lactamase, como OXA-48 ou perda de porina como mecanismo de resistência;

- Em isolados de *K. pneumoniae*, 140 (97,9%) apresentaram resistência ao ertapenem, 141 (98,6%) ao meropenem, 101 (97,1%) ao imipenem, 100% para cefalosporinas de terceira geração, 93,3% as penicilinas e 127 (90%) para ciprofloxacina;

- A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* foram sensíveis a amicacina 138 (97,2%), a gentamicina 70 (50%) e colistina 75 (73,5%);

- 32 cepas isoladas foram resistentes à colistina, que é o antimicrobiano de última escolha utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes;

- O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi detectado em 124 (72,09%) isolados;

- Na técnica de difusão em disco utilizando AFB, 111 isolados (64,53%) foram KPC e por Blue-Carba 121 (70,34%);

- AFB evidenciou 80% de sensibilidade e 75% de especificidade;

- Blue-Carba apresentou 90% de sensibilidade e 81% de especificidade;

- A resistência à colistina foi identificada em 25 isolados de CR-Kp, sendo que 10 (7,19%) pacientes evoluíram a óbito por cepas CR-Kp e três (2,16%) por CPR-Kp;

- 18% das amostras foram positivas para o gene *bla<sub>KPC</sub>* em CPR-Kp neste hospital terciário.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBLER, R. P. The Structure of  $\beta$ -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 289, p. 321-331, 1980.
- ANVISA. Alerta N. 01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2013.
- BABAY, H. A. H. et al. Accuracy of detecting resistance to carbapenems among Gram negative rods: comparison of three methods. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v.4, n. 1, p. 53-61, 2009.
- BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1849-1851, 2016.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.
- BRUCHMANN, S. et al. Deep transcriptome profiling of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals strain- and sequence type-specific adaptation. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4690-4710, 2015.
- CARTER, Y.; SCOTT, J.; PANG, V. Screening for antibiotic-resistant infection. **Nursing Times**, v. 111, n. 21, p. 12-14, 2015.
- CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Rev Liberato**, v. 11, n. 16, p.89-188, 2010.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Document M100-S24**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- COTRIM, E. R. et. al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC em *Enterobacteriaceae*: o desafio das bactérias multirresistentes. **Pós em revista do Centro Universitário Newton Paiva** 1/2012 - edição 5 - issn 2176 7785.
- DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F.L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 365-367, 2010.
- DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.
- DOUMITH, M. et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2300-2305, 2016.
- DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Threedecades of beta-lactamase inhibitors. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, p. 160-201, 2010.

- DUIN, D. V.; DOI, Y. Outbreak of Colistin-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Are We at the End of the Road? **Journal of Clinical Microbiology**, July 2015.
- ENANI, M. A. Antimicrobial resistance Insights from the declaration of world alliance against antibiotic resistance. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 1, p. 11-12, 2015.
- FERNANDES, M. R. et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016.
- FRANKLIN, C.; LIOLIOS, L.; PELEG, A. Y. Phenotypic detection of carbapenem susceptible metallo- $\beta$ -lactamase - producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3139-3144, 2006.
- GARCIA-FERNANDEZ, A. et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 Producing KPC-3 Identified in Italy Carries Novel Plasmids and OmpK36/OmpK35 Porin Variants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2143-2145, 2012.
- GASPAR, G. G. et al. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. april, 2015.
- GIANI, T. et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by clonal expansion of an *mcrB* deletion mutant. **J. Clin. Microbiol.**, n. july, 2015.
- GISKE, C. G. et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 552-556, 2011.
- KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 20, n.136, p. 1-9, 2016.
- LEE, C. R. et al. Global dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*; Epidemiology, genetic context, treatment options and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v.7, june, 2016.
- LENTZ, S. A. et al. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **European Surveillance**, v. 21, n. 26, p. 29-30, 2016.
- LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.
- LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: The impact and evolution of a global menace. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. 28-36, 2017.



- MARQUEZ, C. et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization. **New Microbes and New Infections**, v. 2, p. 58-63, 2014.
- MARTINEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int Microbiol**, v.7, n.4, p.261-8, 2004.
- MOAYEDNIA, R. et al. Frequency assessment of  $\beta$ -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. **Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. Suppl 1, p. S41-45, 2014.
- MONACO, M. et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n.42, 2014.
- MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 333-334, 2009.
- MORRIL, H. J. et al. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, p. 1-15, 2015.
- MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**, v. 13, p. 785-796, 2013.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**.v.67, p. 593-656, 2003.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.
- NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **E Inf Dis**. v. 18, n. 9, p. 1503-1537, 2012.
- PAGES, J. M. Bacterial porin and antibiotic susceptibility. **Med Sci**, v. 20, p. 346-351, 2004.
- PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p. 265-268, 2009.
- PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153-2162, 2002.
- PICÃO, R. C. et al. Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evaluation of double disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM Producing Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.6, p.2028-2037, 2008.
- PINTO, F. M. et al. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, v. 34, p. 47-52, 2014.

- PIRES, J. et al. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests Considerations for better detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 122, p. 33-37, 2016.
- PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281-4283, 2013.
- PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. July, 2015.
- POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v.10, p. 12-26, 2004.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.
- RIBEIRO, V. B. et al. Detection of *bla*<sub>KPC-2</sub> in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2776-7, 2012.
- RODRIGUEZ-BAÑO, J. et al. Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary care and community hospitals. **Clin Microbiol Infect**, v.16, p.1408-1413, 2010.
- SANTOS, A. F. et al. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 191-197, 2013.
- TÄNGDÉN, T.; GISKE, C. G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, p. 501-512, May, 2015.
- TENOVER, F. C. et al. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Med**. v. 3, n. 10, p. 62-70, 2006.
- TSAI, Y. K. et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins *OmpK35* and *OmpK36* play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1485-1493, 2011.
- TSAKRIS, A. et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- $\beta$ -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 1664-1671, 2010.
- YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p. 1151-1161, 2001.
- YONG, D. et al. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- $\beta$ Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.10, p.3798-3801, 2002.